动 物 学 研 究 2001, Aug. 22 (4): 336～339 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

简 报

# 乌龟 *Sox* 基因的克隆及测序

张海军[1] 聂刘旺[1][3] 单祥年[2] 张小爱[1]
(①安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000) (②东南大学医学院生物学教研室 南京 210097)

**摘要**：参照人 *SRY* 基因 HMG-box 保守区的序列，设计 1 对兼并引物，扩增了乌龟（*Chinemys reevesii*）的 *Sox* 基因，并对扩增产物进行了克隆和测序。结果在雌雄个体中均筛选出 4 个不同的 *Sox* 基因，无性别差异性；其 DNA 序列和编码的氨基酸序列与人相应的 *SOX* 基因的相似性分别为 92%、91%、84%、92%和 100%、93%、98%、98%，显示出高度的保守性。

**关键词**：乌龟；*Sox* 基因；克隆；测序
**中图分类号**：Q953，Q959.6⁺3 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)04－0336－04

*SRY* 基因（sex-determining region of Y chromosome）是目前公认的人和哺乳动物睾丸決定因子的

收稿日期：2000－12－25；修改稿收到日期：2001－03－27
基金项目：安徽省自然科学基金（97412002）、江苏省自然科学基金、安徽省教育厅基金（2000JL194ZC）资助项目
③通讯作者：E-mail：lwnie@mail.ahwhptt.net.cn

（上接第 335 页）

bitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*., **24**:7213－7218.
Welsh J, Peterson C, McClelland M *et al*, 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping[J]. *Nucleic Acids Res*., **19**:303－306.

# 用 RAPD 分析四种无尾类的系统演化关系

林 玮 郑翠芳 张彦定 施 瑾 蔡景蕾 高建民
（福建师范大学生物工程学院 福州 350007 bioforest@sina.com）

**摘要**：利用 RAPD 技术检测了分属无尾目 3 个科（雨蛙科、蟾蜍科、蛙科）的黑眶蟾蜍（*Bufo melanostictus*）、中国雨蛙（*Hyla chinensis*）、泽陆蛙（*Rana limnocharis*）、沼水蛙（*R. guentheri*）的系统发生关系。经 19 个随机引物对 4 个物种基因组 DNA 进行扩增，选择其中扩增谱带清晰的 16 个引物进行分析，计算不同科间及同一科内不同种间的遗传距离。结果表明：16 个引物获得的 RAPD 谱带均表现出不同程度的多态性；泽陆蛙与沼水蛙间的亲缘关系最近，而黑眶蟾蜍与中国雨蛙之间的亲缘关系较黑眶蟾蜍与蛙科的泽陆蛙、沼水蛙之间以及中国雨蛙与泽陆蛙、沼水蛙之间的亲缘关系近。从基因组 DNA 水平上也说明雨蛙科与蟾蜍科间的亲缘关系更近，与蛙科的亲缘关系更远。这与形态学、染色体和线粒体 DNA 多态性研究的分析结果一致，从而进一步从分子水平上为无尾目这 3 科的系统演化提供了新的证据。

**关键词**：随机扩增多态 DNA；无尾目；系统演化；基因组 DNA
**中图分类号**：Q951⁺.3，Q959.5⁺3 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)04－0332－05

最佳候选基因（Sinclair *et al*.，1990）。系统演化研究发现，这一基因在性别决定作用中极其重要且十分保守（Koopman *et al*.，1990）。现已在众多的哺乳动物以及进化程度明显不同的物种中检测到 *SRY* 的同源序列，统称这类基因为 *Sox* 基因（*SRY*-box gene）（Hawkins，1992）。该基因的典型特征是具高度保守的 HMG 盒（high mobility group box）（Denny *et al*.，1992）。

在系统演化中，爬行动物是极其古老而又特殊的一支，哺乳动物和鸟类均由此进化而来；且其性别决定机制非常复杂，具有原始性和多样性（Bull，1980）。因此，以 *Sox* 这一保守基因为线索，探索爬行动物性别决定的分子机制，将为人类及高等动物性别决定机制的研究提供模式，对认识脊椎动物性别决定机制的进化具有重要的理论意义。

乌龟（*Chinemys reevesii*）是爬行动物中的常见种（陈壁辉，1991）。目前，关于乌龟的核型、温度对乌龟性别决定和分化的影响等已有报道（郭超文等，1996；高建民等，1986；侯陵，1985）。但迄今为止，尚未对乌龟性别决定的分子机制进行研究。本文采用 PCR 技术，首次对乌龟的 *Sox* 基因进行了研究，旨在为乌龟性别决定的分子机制及 *Sox* 基因的进化等研究提供分子基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物和试剂

实验用的7只（3雌4雄）乌龟，于2000年2月购于安徽省芜湖吉和街市场，活体解剖检查确定性别，均为性成熟个体。

实验用蛋白酶 K、$MgCl_2$、dNTP、Taq DNA 聚合酶、100 bp DNA ladder 等均购于上海生物工程公司。引物参照人 *SRY* 基因 HMG-box 保守区序列及有关文献（Spotila *et al*.，1994；周荣家等，1998；聂刘旺等，2000），上海生物工程公司合成，PAGE 纯化。$P_1$：5'AAGCGACCCATGAA(C \ T)GC(A \ G \ C \ T)TT(C \ T)AT(G \ A \ C \ T)G3'，$P_2$：5'ACGAGGTCGATA(C \ T) TT (A \ G) TA(A \ G) T(C \ T) (G \ A \ T \ C)GG3'，该对引物可特异扩增人 *SRY* 基因 HMG-box 的保守序列，片段长为 216 bp。

### 1.2　组织 DNA 的提取

参照文献（金冬雁等，1996）进行，1%琼脂糖凝胶检测并拍照，4℃保存备用。

### 1.3　PCR 扩增

反应体系：100 ngDNA、1.5 mmol/L $Mg^{2+}$、90 μmol/L dNTP、0.3 μmol/L 引物、1 U Taq 聚合酶，加 $ddH_2O$ 补至 25 μL；循环条件为：97℃预变性 5 min，94℃50 s，55.5℃50 s，72℃50 s，35 个循环，72℃延伸 15 min，4℃保存。1.7%琼脂糖凝胶电泳检测。余下的 PCR 产物用纯化试剂盒进行纯化。

### 1.4　PCR 产物的克隆

取纯化后雌雄乌龟个体 *Sox* 基因的 PCR 产物分别克隆；连接反应及转化均按 pGEM-T 载体试剂盒的说明书进行；不同阳性克隆的筛选采用菌落 PCR 和 SSCP 方法。

### 1.5　测序及数据分析

委托北京赛百盛生物技术公司对筛选到的不同阳性克隆进行测序，并推测编码的氨基酸序列；采用 Blast 方法，联机与 GenBank 进行 DNA 及氨基酸序列相似性检索。

## 2　结果与分析

### 2.1　扩增结果

雌、雄龟均扩出 1 条带，且带型一致，大小均为 220 bp 左右，与阳性对照一致。此结果初步说明了乌龟基因组中存在有人的 *SRY* 基因的同源基因。

### 2.2　乌龟的 *Sox* 基因

筛选到 4 个不同的阳性克隆，且为雌雄个体所共有。经序列分析发现这些克隆代表不同的 *Sox* 基因，根据其与人 *SOX* 基因的相似性，分别命名为 *CRSox*4、*CRSox*11、*CRSox*14、*CRSox*21。其 DNA 序列见图 1，推测编码氨基酸的序列见图 2。

## 3　讨　论

### 3.1　关于 *SRY* 基因的起源

1991 年 Tiersch 等利用哺乳动物 *SRY* 保守序列区的 1 个探针对多种脊椎动物进行了杂交分析，性别特异的杂交带仅出现在人和哺乳类，而在鱼类、鸟类、爬行类和无颌类等雄性和雌性中均有一致的杂交带，无性别差异性。本文结果再次验证了这一点。目前一般认为 *SRY* 基因最初位于常染色体上，含有性别决定的基因染色体渐渐地发生倒位、重复、交换，从而导致染色体分化，即由同型向异型分化。通过系统分析表明，原始 *SOX* 基因（在人类中为一与 X 染色体连锁的 *SOX*3 基因）编码一种 DNA 结合蛋白，可在雌雄胚胎个体发育中起作用。该基因位于原始X染色体和Y染色体上，后伴随Y

```
CRSox 4   GTGTGGTCCCAGATCGAGAGGCGGAAGATCATGGAGCAGTCCCCGGACATGCACAACGCC
CRSox 11  GTGTGGTCTAAAATCGAGAGGAGAAAAATCATGGAGCAGTCTCCGGACATGCACAACGCG
CRSox 14  GTGTGGTCCCGGGGCCAGAGGCGGAAGATGGCCCAGGAGAACCCTAAAATGCACAACTCG
CRSox 21  GTGTGGTCCCGGGCGCAGCGCCGGAAGATGGCCCAGGAGAACCCCAAGATGCACAACTCG
          ********        ** *  * ** **     ** **   **  * ********* *
CRSox 4   GAGATCTCCAAGCGCCTGGGCAAGCGCTGGAAGCTGCTCAAGGACAGCGACAAGATCCCC
CRSox 11  GAGATCTCCAAGCGCCTGGGCAAGCGGTGGAAAATGCTGAAGGACAGCGAGAAGATCCCC
CRSox 14  GAGATTAGCAAACGGCTGGGCGCGGAGTGGAAGCTGCTGTCGGAGGCTGAGAAACGACCC
CRSox 21  GAGATCAGCAAGCGCCTGGGGGCCGAGTGGAAGCTGCTCACCGAGGCCGAGAAGCGGCCC
          *****   *** ** *****       *****  ****    **    ** **    ***
CRSox 4   TTCATCCGGGAGGCGGAGCGGCTGAGGCTCAAGCACATGGCGGACTAT
CRSox 11  TTCATCCGGGAGGCAGAGAGACTGAGGCTCAAACACATGGCCGATTAC
CRSox 14  TATATCGACGAGGCCAAAAGGCTCCGGGTGCAGCACATGAAGGAGCAT
CRSox 21  TTCATCGACGAGGCCAAGCGGCTGCGGGCCATGCACATGAAGGAGCAT
          *  ***   *****  *  * **  **      ******   **  *
```

图 1 乌龟 *Sox* 基因 HMG 盒区的 DNA 序列（* 表示一致的核苷酸）

Fig.1 The HMG-box DNA sequence of *Sox* genes of *C. reevesii*

```
CRSox 4   VWSQIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKLLKDSDKIPFIREAERLRLKHMADY
CRSox 11  VWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKMLKDSEKIPFIREAERLRLKHMADY
CRSox 14  VWSRGQRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLSEAEKRPYIDEAKRLRVQHMKEH
CRSox 21  VWSRAQRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLTEAEKRPFIDEAKRLRAMHMKEH
          ***   ***     * *** *******  ** *    * * * ** ***  **
```

图 2 乌龟 *Sox* 基因 HMG 盒区 DNA 序列的编码序列（*表示一致的氨基酸）

Fig.2 The amino acid sequence of *Sox* genes of *C. reevesii*

染色体的形成过程（在人类中 *SOX*3 HMG-box 外发生突变和丢失）而获得了雄性性别决定的关键功能，在 Y 染色体上保留下来。而其他较低等的脊椎动物由于 Y 染色体尚未分化，所以在雌雄个体基因组中 *Sox* 基因基本一致，而无性别差异性（Grave，1998）。

### 3.2 乌龟 *Sox* 基因保守性

DNA 序列相似性分析结果显示，乌龟 *CRSox*4、*CRSox*11、*CRSox*14、*CRSox*21 基因与人类相应 *SOX* 基因的一致性分别为 92%、91%、84%、92%；而与蛇鳄龟（一种爬行动物）相应 *Sox* 基因的一致性分别为 96%、94%、89%、95%。氨基酸序列相似性分析结果显示，乌龟 *CRSox*4、*CRSox*11、*CRSox*14、*CRSox*21 基因与人类相应 *SOX* 基因编码氨基酸的一致性分别为 100%、93%、98%、98%；而与蛇鳄龟相应 *Sox* 基因编码氨基酸的一致性分别为 100%、94%、98%、98%。这些结果显示乌龟 *Sox* 基因与人类及部分爬行动物的 *SOX*（*Sox*）基因不仅在 DNA 序列上而且在其编码的氨基酸序列上都存在高度进化保守性。*SOX*（*Sox*）基因的这种高度进化保守性可能反应了其功能上的相似性。

### 3.3 乌龟性别决定机制的探讨

龟鳖类性别决定机制极其复杂，存在有基因型性别决定（genetic sex determination，GSD）和环境性别决定（environmental sex determination，ESD）等多种类型（Bull，1980）。实验表明，多数龟鳖类胚胎发育成雌性或雄性是由受精卵的孵育温度来决定，这种现象称为温度依赖型性别决定（temperature-dependent sex determination，TSD）。乌龟受精卵在高温（30～35℃）下孵出的子代为雌性，在低温下（20～27℃）孵出的为雄性，初步证明乌龟

的性别决定为TSD机制（侯陵，1985）。一般认为，没有性别染色体的分化可能是TSD机制的共同特征，也就是说，具TSD机制的种类，雌雄间具遗传上的同质性。核型分析的结果排除了乌龟异形性染色体存在的可能性（郭超文等，1996；高建民等，1986），本文乌龟 *Sox* 基因序列分析的结果也未发现有雌雄个体的差异，进一步证明乌龟的性别决定为TSD机制。至于乌龟 *Sox* 基因的功能及其表达还需进一步研究。

## 参 考 文 献


Bull J J, 1980. Sex determination in reptiles[J]. *Quar. Rev. Biol.*, **55**: 3 - 21.

Chen B H, 1991. The Amphibian and Reptilian Fauna of Anhui [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press. 180 - 183. [陈壁辉，1991 安徽两栖动物志. 合肥：安徽科学技术出版社. 180 ~ 183.]

Denny P, Swifts, Brand N *et al*, 1992. A conserved family of genes related testis-determining gene *SRY*[J]. *Nucleic. Acid. Res.*, **20**: 2887 - 2388.

Gao J M, Ye B Y, Ding H B, 1986. A Preliminary study on the karyotype of *Chinemys reevesii* [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **5**(2): 98 - 101. [高建民，叶冰莹，丁汉波，1986. 乌龟染色体的初步研究. 两栖爬行动物学报，5(2): 98 ~ 101.]

Grave J A, 1998. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes[J]. *J. Exp. Zool.*, **281**(5): 472 - 481.

Guo C W, Nie L W, Wang M, 1996. The karyotypes and NORs of two *Chinemys*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, **15**(Suppl.): 97 - 104. [郭超文，聂刘旺，汪　鸣，1996. 两种乌龟染色体组型和 Ag NORs 的比较研究. 四川动物，**15**(增刊): 97 ~ 104.]

Hawkins J R, 1992. Sex determination[J]. *Hum. Mol. Genet.*, **3**: 1463 - 1465.

Hou L, 1985. Sex determination by temperature for incubation in *Chinemys reevesii*[J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **4**(2): 130 - 133. [侯陵，1985. 孵化温度与乌龟的性别. 两栖爬行动物学报，4(2): 130 ~ 133.]

Koopman P, Gubbay J, Vivian N *et al*, 1991. Male development of chromosomally female transgenic for *Sry*[J]. *Nature*, **351**(6322): 117 - 121.

Nie L W, Shan X N, Guo C W *et al*, 2000. The clone and sequence analysis of *Sox* gene in the *P. megacephalum*[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, **9**(2): 106 - 109. [聂刘旺，单祥年，郭超文等，2000. 平胸龟 *Sox* 基因的克隆和序列分析. 激光生物学报，9(2): 106 ~ 109.]

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1992. Molecular Cloning[M]. Translated by Jin D Y, Li M F. Beijing: Science Press. [萨姆布鲁克 J，费里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T，1992. 分子克隆实验指南. 金冬雁，黎孟枫译. 北京：科学出版社.]

Sinclair A H, Berta P, Palmer M S *et al*, 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif[J]. *Nature*, **346**(6281): 240 - 245.

Spotila L D, Kaufer N F, Theriot E. 1994. Sequence analysis of the ZFY and SOX genes in the turtle *Chelydra serpentina*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3**(1): 1 - 9.

Tiersch T R, 1991. Studies on the phylogenetic conservation of *SRY* gene [J]. *Hum. Genet.*, **87**: 571 - 573.

Zhong R J, Cheng H H, Yu Q X, 1998. *Sox* gene and *Zfx* gene of panda [J]. *Science in China* (Series C), **28**(6): 516 - 520. [周荣家，程汉华，余其兴，1998. 大熊猫 *Sox* 基因和 *Zfx* 基因. 中国科学(C辑)，**28**(6): 516 ~ 520.]


# Cloning and Sequencing of the *Sox* Genes in *Chinemys reevesii*


ZHANG Hai-Jun[①]　NIE Liu-Wang[①]　SHAN Xiang-Nian[②]　ZHANG Xiao-Ai[①]

(①*College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu* 241000, *China*)

(②*Department of Biology, Medical College of Southeast University, Nanjing* 210097, *China*)



**Abstract**: Using a pair of degenerate primers based on the conservative region, HMG-box, of human *SRY* gene, four different fragments were amplified from both female and male *Chinemys reevesii*, then cloned by using pGEM-T vector and sequenced. The sequence result indicated their high homology to human *Sox* genes. The identities to human *Sox* genes in the DNA sequence and the amino acid sequence are 92%, 91%, 84%, 92% and 100%, 93%, 98%, 98%, respectively. It might be concluded that *Sox* gene was highly conservative in phylogenesis. Our work provides molecular data for the study of sex-determining mechanism of *C. reevesii*, which might be temperature-dependent sex determination.



**Key words**: *Chinemys reevesii*; *Sox* gene; Cloning; Sequencing